PREMIER JOUR

1. Recherche de *Salmonella* dans un bouillon « B »

Réaliser les examens microscopiques nécessaires.

Isoler sur un milieu sélectif fourni (milieu « **SS** » : composition en **annexe 1**).

- **Questions**

Quels sont les agents sélectifs présents dans le milieu SS ? Quelle est sa sélectivité ?

Quelle sera l'aspect des colonies suspectes sur ce milieu ? Justifier.

2. Identification d'une souche suspecte « S » isolée sur GNI

Réaliser les examens microscopiques nécessaires.

Effectuer un test enzymatique rapide approprié.

A l'aide de l'**annexe 2**, proposer sur le compte-rendu une **orientation de diagnostic** et un choix **justifié** de galerie d'identification **en tubes** (macrométhode) à ensemencer pour identifier la souche.

Ensemencer les milieux fournis.

Préciser sur le compte-rendu et sur les milieux ensemencés, la température d'incubation souhaitée.

3. Inversion de phase en vue de la détermination du sérovar d'une *Salmonella*

Les antigènes O : 4,5 et H : 1,2 (Cf. **annexe 3**) ont été identifiés chez cette *Salmonella*. A partir de la souche pure de *Salmonella* ensemencée en bouillon noté « T », procéder à l'inversion de phase par la méthode de Sven Gard.

3.1. Protocole de la méthode de Sven Gard

Déposer 2 gouttes de sérum SG6 (anti H : 1,2) au fond d'une boite de Pétri vide et stérile.

Ajouter 1 mL d'eau distillée et agiter par rotation **délicate**.

Couler la gélose de Sven Gard maintenue en surfusion.

Agiter le milieu par rotation **délicate** pour homogénéiser milieu et sérum.

Laisser prendre en masse.

Ensemencer **au centre** de la gélose par une goutte de culture. Laisser reposer quelques minutes.

Incuber **sans retourner** la boîte pendant 18 heures à 37°C.

3.2. Compte-rendu

Les antigènes H existent sous deux phases (phase 1 et phase 2). L'expression de ces phases est soumise à une régulation génétique. A l'aide des informations de l'**annexe 4**, expliquer, en complétant le schéma fourni, le mécanisme génétique permettant l'inversion de phase chez *Salmonella*.

Expliquer le principe de la méthode de Sven Gard et montrer son intérêt.

4. Mise en évidence de phages de *Salmonella* O : 1 dans une suspension

4.1. Matériel et réactifs

- suspension de phages O : 1 notée « O1 »
- culture en bouillon de *Salmonella* sensible au phage O : 1 notée « T »
- P200 et cônes stériles
- un milieu nutritif coulé en boite de Pétri
- 1 tube contenant 5 mL de gélose molle en surfusion

4.2. Mode opératoire

Dans le tube de gélose molle en surfusion, introduire :

- 0,2 mL de culture de *Salmonella* sensible au phage O : 1,
- 0,1 mL de suspension de phages O : 1.

Verser rapidement le mélange sur la gélose coulée en boîte de Pétri. Laisser solidifier.

Incuber les boîtes 24h à 37°C.

4.3. Questions

A l'aide de l'**annexe 6**, réaliser un schéma légendé du phage O : 1.

Décrire l'action du phage sur une Salmonelle O : 1.

Comment les phages seront-ils mis en évidence après incubation ?

DEUXIEME JOUR

1. Recherche de *Salmonella* dans un bouillon « B »

1.1. Lecture de l'isolement sur milieu SS

Repérer cinq colonies suspectes et réaliser un test « **uréase rapide** » :

- répartir le contenu d'un flacon de milieu urée-indole (1,5 mL) dans cinq tubes à hémolyse,
- dans chaque tube, introduire **une** colonie suspecte,
- incuber au bain-marie à 37°C pendant 2 heures,
- effectuer la lecture du caractère uréase pour chaque colonie testée.

1.2. Compte-rendu

Décrire les colonies obtenues sur le milieu SS en précisant lesquelles sont suspectes.

A l'aide de l'**annexe 2**, expliquer l'intérêt du test « uréase rapide » dans le cadre de la mise en évidence du genre *Salmonella*.

Quelles sont les modalités de lecture du test uréase ?

Présenter les résultats obtenus pour les cinq colonies testées et conclure.

2. Identification d'une souche suspecte « S » isolée sur GNI

Effectuer les lectures.

Identifier (en justifiant la démarche) la famille et le genre de la souche suspecte.

Poursuivre l'identification jusqu'au sérovar si nécessaire, en suivant les indications fournies dans l'**annexe 5**, et en utilisant la classification des Salmonelles donnée en **annexe 3**.

Sur le compte rendu, décrire la démarche adoptée et donner le nom du sérovar identifié.

3. Inversion de phase en vue de la détermination du sérovar d'une *Salmonella*

Schématiser le résultat obtenu. Montrer la localisation des colonies ayant subi l'inversion de phase.

Poursuivre l'identification jusqu'au sérovar.

Sur le compte rendu, décrire la démarche adoptée et donner le nom du sérovar identifié.

4. Mise en évidence de phages de *Salmonella* O : 1 dans une suspension

Schématiser le résultat obtenu.

Si cela est possible, compter le nombre d'unités formant plage (UFP) obtenues.

En déduire la concentration en phages dans la suspension initiale.

Annexe 1

Composition du milieu SS

	g / L^{-1}
peptone	5,0 g
extrait de viande	5,0 g
lactose	10,0 g
citrate de sodium	10,0 g
citrate de fer III	1,0 g
sels biliaires	8,5 g
vert brillant	3,3 mg
rouge neutre	25 mg
thiosulfate de sodium	8,5 g
agar	12,0 g
pH = 7,3	

Annexe 2

Quelques données sur le genre *Salmonella*

Le genre *Salmonella* appartient à la famille des *Enterobacteriaceae* dont les principaux caractères des genre et espèces sont donnés ci-dessous (« Identification des entérobactéries » ; Le Minor, C. Richard 1994)

	Salmonella (1)	*Citrobacter freudii*	*Levinea*	*Escherichia coli*	*Shigella*	*Klebsiella pneumoniae*	*Enterobacter cloaceae*	*Hafnia alvei*	*Serratia marcescens*	*Proteus vulgaris*	*Proteus mirabilis*	*Proteus morganii*	*Proteus rettgeri*	*Providencia*	*Yersinia enterolitica*	*Yersinia pseudotuberculosis*
Mobilité	+	+	+	+	-	-	+	+*	+	+	+	+	+	+	+*	+*
Lactose	-	+ ou (+)	-	+ ou (+)	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	
ONPG	-	+	+	+	d	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+
H2S	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
LDC	+	-	-	d	-	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-
ODC	+	-	+	d	d	-	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-
ADH	-	-	d	d	d	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Uréase	-	-	-	-	-	+*	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+
TDA,PDA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-
Indole	-	-	+	+	d	-	-	-	-	+	-	+	+	+	d	-
Citrate de Simmons	+	+	+	-	-	+	+	d*	+	d	d	-	+	+	-	-
Malonate	-	-	d	-	-	+	+	d	-	-	-	-	-	-	-	-
VP	-	-	-	-	-	+	-	+*	+	-	d	-	-	-	d*	-
TTR	+	+	d	-	-	-	-	d	d	+	+	+	+	+	d	-
Gélatinase	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-
Gaz/glucose	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	d	d	-	-
Mannitol	+	+	+	d	d	+	+	+	+	-	-	-	+	d	+	+
Rhamnose	+	+	+	d	d	+	+	+	-	-	-	-	d	-	-	+
Saccharose	-	d	d	d	-	+	+	-	+	+	d	d	-	d	+	-
Arabinose	+	+	+	+	d	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	d
Inositol	d	-	-	-	-	+	d	-	d	-	-	-	+	d	-	-
Aldonitol	-	-	d	-	-	+	d	-	d	-	-	-	+	d	-	-
Galacturonate	-	+	+	+	d	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	d

LDC : Lysine décarboxylase
ODC : Ornithine décarboxylase
ADH : Arginine dihydrolase
TDA, PDA : Tryptophane et Phénylalanine désaminase
ONPG : Orthonitrophényl ß D galactopyranoside

Sauf pour les méthodes rapides (test ONPG, uréase désaminase) :
+ : positif en 2 à 3 jours
- : négatif
d : différents types biochimiques
+* et d* positif à 22°C, négatif à 37°C
+* : positif lent (uréase + en 18 - 24 heures)
(+) : positif en 3 à 7 jours

(1) *Salmonella* exceptions importantes :
S.I.ser. Typhi A : LDC +, ODC -, Citrate -, gaz -, H_2S traces
S.I. ser.Paratyphi A : LDC +, ODC +, Citrate -, gaz -, H_2S traces
(2) *P. morganii syn. Morganella morganii*

D'après le centre collaborateur O.M.S. de référence et de la recherche pour les *Salmonella* (Institut Pasteur, service du Pr Grimont), le genre *Salmonella* comprend deux espèces :
(1) S.enterica divisée en 6 sous-espèces différenciables par leur caractères biochimiques :

- *S. enterica* subsp. *enterica*
- *S. enterica* subsp. *salamae*
- *S. enterica* subsp. *arizonae*
- *S. enterica* subsp. *diarizonae*
- *S. enterica* subsp. *houtenae*
- *S. enterica* subsp. *indica*

et (2) S.bongori
Les sérovars les plus fréquents (99,5 % des souches isolées) sont rencontrés dans la sous-espèce *S. enterica* subsp. *enterica.*

Annexe 3

EXTRAIT DU TABLEAU DE KAUFFMANN-WHITE

Tableau des sérovars les plus fréquents (données de 1999)

Groupe O : 4 (B)

	O	H	
Typhimurium	1,4,[5],12	i	1,2
Heidelberg	1,4,[5],12	r	1,2
Derby	1,4,[5],12	f,g	-
Brandenburg	1,4,12	l,v	e,n,z_{15}
Saintpaul	1,4,12,27	e,h	1,2
Bredeney	1,4,12,27	l,v	1,7
Paratyphi B	1,4,[5],12	b	1,2
Schwarzengrund	1,4,12,27	d	1,7
Coeln	4,[5],12	y	1,2
Wien	1,4,12,27	b	l,w
Duisburg	1,4,12,27	d	e,n,z_{15}
Abortusovis	4,12	c	1,6
Stanley	1,4,[5],12,27	d	1,2
Reading	1,4,[5],12	e,h	1,5
Sandiego	4,[5],12	e,h	e,n,z_{15}

Groupe O : 9 (D)

Enteritidis	1,9,12	g,m	-
Typhi	9,12 [Vi]	d	-
Dublin	1,9,12 [Vi]	g,p	-
Panama	1,9,12	l,v	1,5
Gallinarum*	1,9,12	-	-

Groupe O : 6,7 – 6,8 – 8 ($C_1 - C_2 - C_3$)

Hadar	6,8	z_{10}	e,n,x
Virchow	6,7	r	1,2
Infantis	6,7	r	1,5
Newport	6,8	e,h	1,2
Bovismorbificans	6,8	r	1,5
Goldcoast	6,8	r	l,w
Braenderup	6,7	e,h	e,n,z_{15}
Montevideo	6,7	g,m,s	-
Livingstone	6,7,14	d	l,w
Manhattan	6,8	d	1,5
Blockley	6,8	k	1,5
Mbandaka	6,7	z_{10}	e,n,z_{15}
Thompson	6,7	k	1,5
Ohio	6,7,14	b	l,w
Muenchen	6,8	d	1,2
Kottbus	6,8	e,h	1,5
Tennessee	6,7,14	z_{29}	-
Isangi	6,7	d	1,5
Litchfield	6,8	l,v	1,2
Rissen	6,7,14	f,g	-
Kentucky	8,20	i	z_6
Emek	8,20	g,m,s	-

Groupe O : 3,10 – 3,15 – 1,3,19 ($E_1 - E_2 - E_4$)

Anatum	3,10	e,h	1,6
Senftenberg	1,3,19	g,s,t	-
London	3,10	l,v	1,6
Give	3,10,[15]	l,v	1,7
Muenster	3,10	e,h	1,5
Meleagridis	3,10	e,h	l,w
Uganda	3,10	l,z_{13}	1,5
Lexington	3,10	z_{10}	1,5

Groupe O : 13,22 – 13,23 ($G_1 - G_2$)

Kedougou	1,13,23	i	l,w
Worthington	1,13,23	z	l,w
Ibadan	13,22	b	1,5
Havana	1,13,23	f,g,s	-

Groupe O : 18 (K)

S.III a* (arizonae)	18	z_4,z_{32}	-

Groupe O : 1,2 (A)

Paratyphi A**	1,2,12	a	-

Facteurs O soulignés (exemple 1,4,12) : présence liée à la conversion bactériophagique.
Facteurs entre crochets (exemple 9,12,[Vi]) : facteur à déterminisme chromosomique, qui peut être présent ou absent sans que le diagnostic de sérotype soit changé.

Dans chaque groupe O, les sérotypes sont rangés par ordre de fréquence.
Fréquence des groupes O

B	51,8%
C	20,3%
D	19,1%
E	6,2%
G	1,2%
A	0,24%

* rencontrés essentiellement chez les volailles
** la très grande majorité des cas est importée d'Afrique ou d'Asie

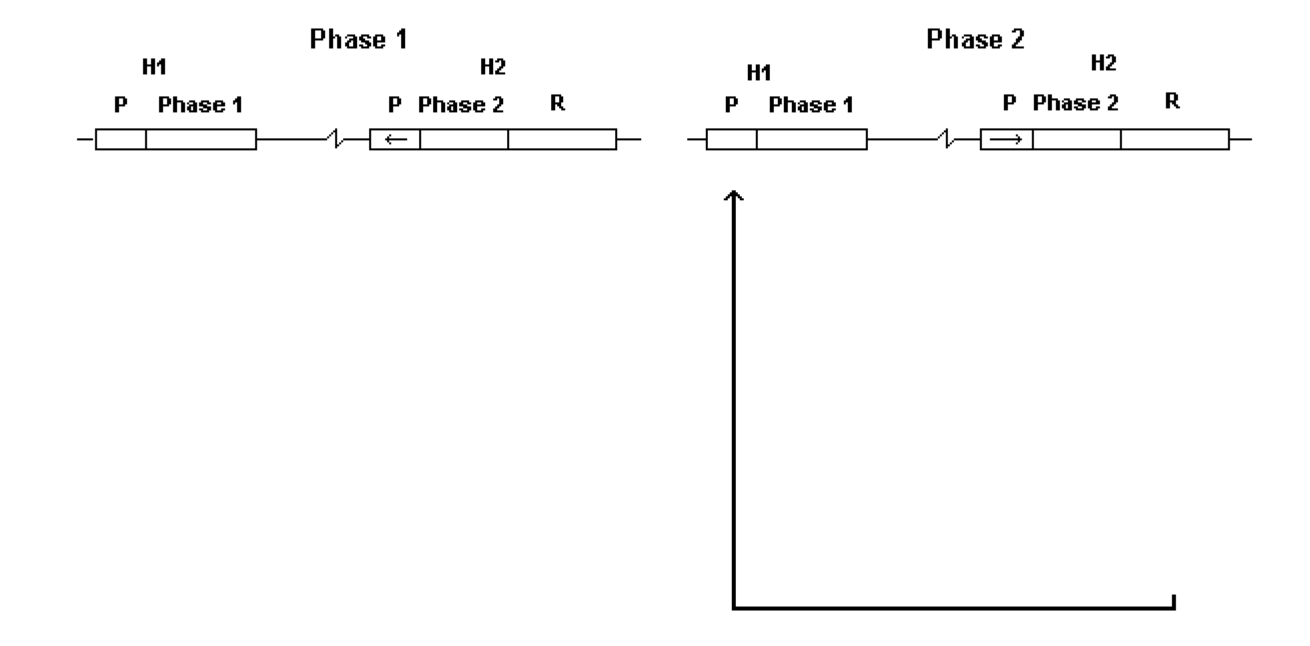
Annexe 4

INVERSION DE PHASE DES SALMONELLES

La plupart des sérovars de *Salmonella* sont susceptibles d'exprimer alternativement deux protéines flagellaires différentes : un antigène H de type l (produit du gène H1) et un antigène H de type 2 (produit du gène H2).

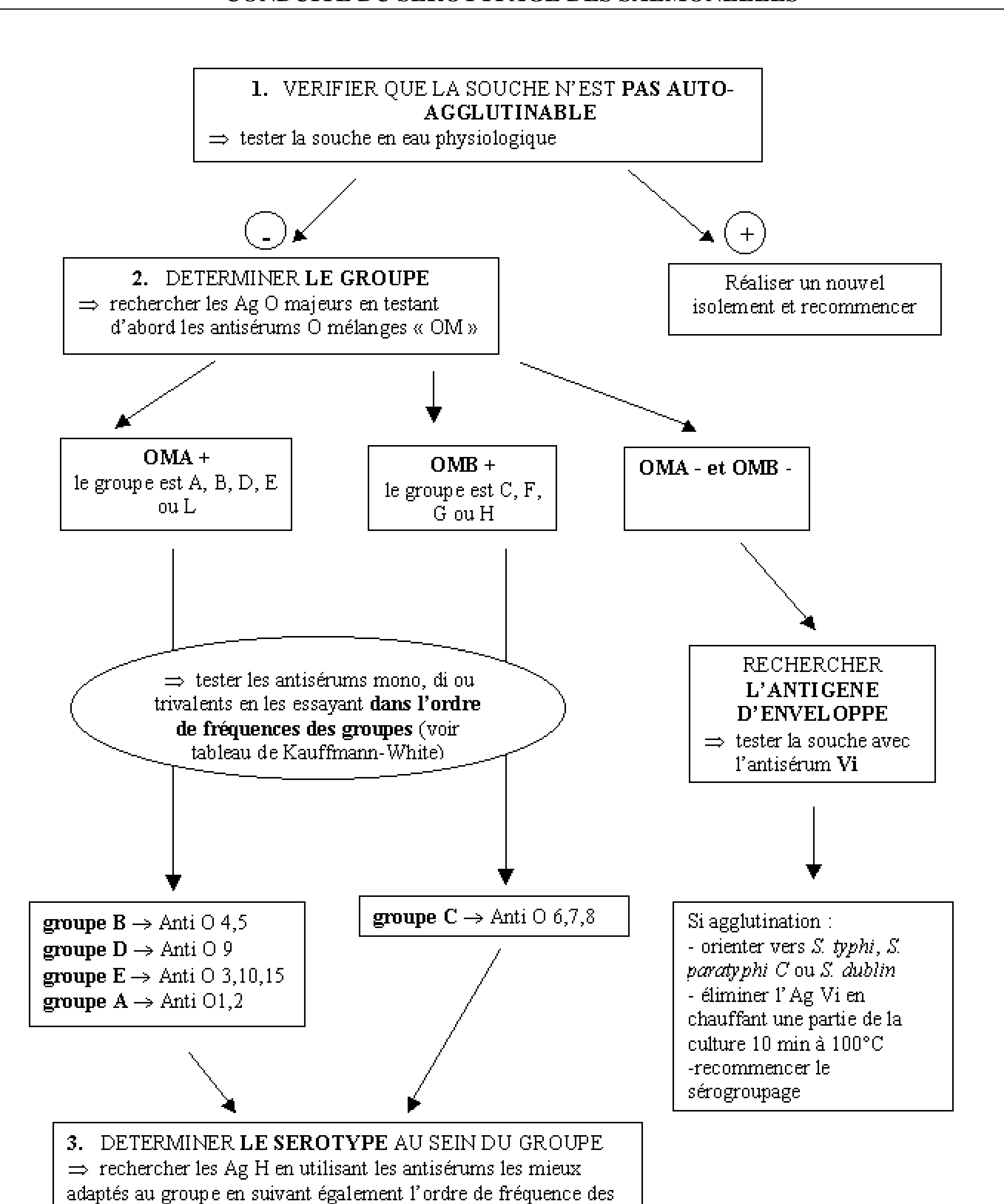
Chaque *Salmonella* exprime exclusivement une des deux protéines, mais lors du développement d'un clone, une bactérie produisant l'autre type de flagelline apparaît spontanément avec une fréquence de l'ordre de 10^{-3}.

Le répresseur de la phase 1 est un gène de l'opéron de la phase 2 : si l'opéron H2 est fonctionnel, alors le gène H1 n'est pas transcrit. H2 dépend d'un promoteur-opérateur soumis à une inversion du sens de l'ADN correspondant qui peut ainsi être ou ne pas être fonctionnel.



Annexe 5

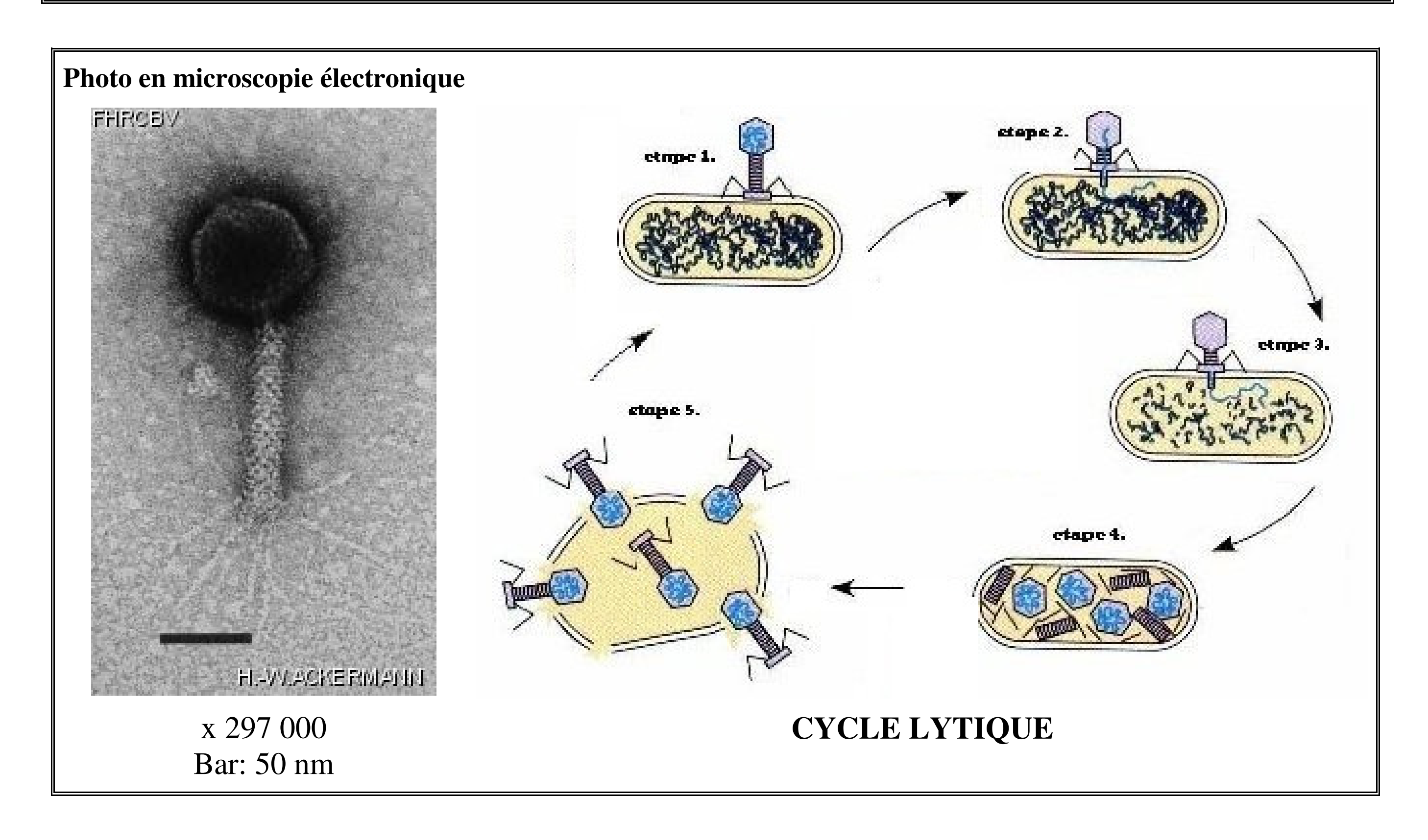
CONDUITE DU SEROTYPAGE DES SALMONELLES



Annexe 6

Identification			
Nom	**Morphotype**		
O1	A1 ?		
Ordre	**Famille**	**Genre**	**Espèce**
Caudovirales	*Myoviridae*		O1
Autres désignations			
7	Felix O1	Felix O-1	

Photo en microscopie électronique



x 297 000
Bar: 50 nm

CYCLE LYTIQUE

Sources :

http://www.phage.ulaval.ca/index.php?pageDemandee=phage&noPhage=40

http://membres.lycos.fr/nabiga/definitions/virus.html